

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



537 117

(43) 国際公開日  
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/049805 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A01N 57/12, 59/06

広島市 北の里 27 番地の 4 北海三共株式会社内  
Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015543

(74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京  
都 港区 虎ノ門 1 丁目 2 2 番 1 2 号 SVAX T S ビ  
ル Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-352697 2002 年 12 月 4 日 (04.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共  
アグロ株式会社 (SANKYO AGRO COMPANY, LIM-  
ITED) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都 文京区 本郷 4 丁目  
2 3 番 1 4 号 Tokyo (JP). 北海三共株式会社 (HOKKAI  
SANKYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒060-0042 北海道 札幌  
市 中央区大通西 8 丁目 1 番地 Hokkaido (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 粟倉 大輔  
(AWAKURA, Daisuke) [JP/JP]; 〒061-1111 北海道 北  
広島市 北の里 27 番地の 4 北海三共株式会社内  
Hokkaido (JP). 木村 清 (KIMURA, Kiyoshi) [JP/JP];  
〒061-1111 北海道 北広島市 北の里 27 番地の  
4 北海三共株式会社内 Hokkaido (JP). 増田 和義  
(MASUDA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒061-1111 北海道 北

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 補正書・説明書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PREVENTING WHEAT FROM MYCOTOXIN CONTAMINATION

(54) 発明の名称: 麦類のマイトキシシン汚染抑制方法

(57) Abstract: It is intended to search for a cultivation method for reducing the content of mycotoxins in wheat which bring serious concerns for the qualities of wheat in the production sites and consumers' health risks. Namely, a method of reducing the content of mycotoxins in wheat characterized by comprising applying to wheat one or more compounds A selected from the group consisting of ammonium salts, primary to quaternary ammonium salts, alkali metal salts, alkaline earth metal salts and polyvalent metal salts of phosphorous acid and phosphorous acid esters.

(57) 要約: 小麦の生産現場における品質および消費者に対する健康被害リスク上、重要懸念事項となっている小麦中のマイトキシシン汚染量を抑制する栽培方法を探索する。本発明は、亜リン酸及び亜リン酸エステル、アンモニウム塩、第 1 ~ 4 級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の化合物 A を麦類に施用することを特徴とする、麦類中のマイトキシシン汚染量を抑制する方法を開示する。

WO 2004/049805 A1

## 明 細 書

## 麦類のマイトキシン汚染抑制方法

## 5 技術分野

- 亜リン酸及び亜リン酸エステルの、アンモニウム塩、第1～4級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される1種又は2種以上の化合物Aを有効成分として含有する農園芸用組成物を用いて麦類の植物病原性真菌が産生するマイトキシン（以下「DON」と表記する）の麦類への汚染量を軽減することを意図した処理方法に関するものである。

## 背景技術

- 麦類の赤かび病は、出穂期から乳熟期にかけて曇天、小雨が続き、しかも高温の場合に多く発生し（尾関 幸男、佐々木 宏、天野 洋一：北海道の畑作技術－麦類編－、農業技術普及協会刊行、1978年、P.209）、収量・品質等の面から麦類に大きな被害をもたらす植物病害であり、登熟期間中に降水量の多い我が国では避けることが出来ない。その主要病原性真菌としては *Fusarium graminearum*、*Fusarium culmorum*、*F. avenaceum* および *Microdochium nivale* が特定されており、気候条件や地域により占有率に差があるものの病害発生圃場では複合感染が認められる場合が多い（岸 国平：日本植物病害大辞典、全国農村教育協会刊行、1998年、P.74）。

- この病害の原因となる植物病原性真菌はマイトキシンと称される複数の有毒代謝物を産生し耕種中の作物を汚染し、収穫物や加工食品への移行を経て人間や家畜による摂取の危険性をもたらしている。欧州、北米および東アジアといった麦類栽培の盛んな地域におけるマイトキシンに関する研究の歴史は古く、毒性・汚染量の両面から人畜への影響が最も懸念される毒物としてDONが特定され世界的に注目を集めている。DONに汚染された食品の摂取は、嘔吐・下痢を中心とした消化器症状を主症状とする急性中毒を引き起こす。すでに欧

州並びに北米では穀物中における DON 汚染量の自主規制値を設定し、監視強化の体制を整えつつある。このように DON 監視の機運が国際的に高まる中で、2002年、我が国でも厚生労働省が小麦中 DON 汚染量の暫定基準値 1.1 ppm を設定し、市場に流通する小麦の安全性を確保する旨通達を行った（食発第 0521001 号）。これに関連して、飼料安全法上の指導通知として農林水産省は 3 ヶ月齢以上の牛に給与される飼料中のデオキシニバレノールの暫定許容値 4.0 ppm、それ以外の家畜には 1.0 ppm を設定した（プレスリリース）。かび産生毒素として DON が注目される以前は、玄麦出荷段階における目視検査で赤かび病被害粒混入率を 1%未満とする法規制を行うことで、かび毒による健康的リスクから国民を守ってきた。このため麦類生産現場では麦類赤かび病原性真菌に有効な殺菌剤を施用することで赤かび病害を軽減・抑制する努力が行われてきた。

現在汎用されている麦類赤かび病原性真菌に有効な薬剤は、その作用機溝および有効成分の化学構造から数種のグループへ分類される（農薬ハンドブック 2001 年版、日本植物防疫協会刊行）。真菌の生体膜成分として普遍的に存在するステロールの生合成阻害を特徴とする SBI 剤としては、(RS)-1-*p*-クロロフェニル-4,4-ジメチル-3-(1*H*-1,2,4-トリアゾール-1-イルメチル)ペンタン-3-オール（一般名：テブコナゾール）、(1*RS*, 5*RS*)-5-(4-クロロベンジル)-2,2-ジメチル-1-(1*H*-1,2,4-トリアゾール-1-イルメチル)シクロペンタノール（一般名：メトコナゾール）、1-[2-(2,4-ジクロロフェニル)-4-プロピル-1,3-ジオキソラン-2-イルメチル]-1*H*-1,2,4-トリアゾール（一般名：プロピコナゾール）が挙げられ、化学構造的にはトリアゾール骨格を有することを特徴とする。低薬量での効力発揮、植物体内への迅速な浸透性による耐雨性および、訪花昆虫に対する低毒性等の理由から幅広く使用されており、麦類赤かび病原性真菌に対する防除効果も高い。抗かび性抗生物質でメトキシアクリル酸エステルを構造的長とするストロビルリンの誘導体として開発されたメチル-(*E*)-2-{2-[6-(2-シアノフェノキシ)ピリミジン-4-イルオキシ]フェニル}-3-メトキシアクリレート（一般

- 名：アゾキシストロビン）、メチル＝（*E*）－２－メトキシイミノ〔 $\alpha$ －（*o*－トリルオキシ）－*o*－トリル〕アセテート（一般名：クレソキシムメチル）はメトキシアクリレート系殺菌剤に分類される。前者は菌の呼吸活動の阻害、後者はミトコンドリア内のチトクローム電子伝達系の阻害により防除効果を発揮する。その他合成殺菌剤としては１，１’－イミノジ（オクタメチレン）ジグアニジウム＝トリアセテート（一般名：イミノクタジン酢酸塩）が挙げられるが、その塩構造に由来する界面活性剤的性質より、菌類の膜脂質二重層構造の破壊を引き起こすことが作用機作として考えられている。更に、病原性真菌と薬効の関連性についても研究が行われ、*F. graminearum*、*F. culmorum*、
- 5 *F. avenaceum* の３種にはトリアゾール剤、*M. nivale* にはメトキシアクリレート剤が卓効を示すことも明らかにされている。先にも述べたが、病害発生には複数の病原性真菌の混在を伴うことが多い為、各剤の特徴を活かしたローテーション散布を行うことで病害発生の予防並びに抑制が行われている。
- DON への注目に伴いその汚染濃度の分析が進むにつれ赤かび病罹病程度と
- 15 DON 汚染量の間に直接的な関連性がないことが明らかになりつつある（Bai, G-H, Plattner, R and Desjardins, A. : Relationship between Visual Scab Ratings and Deoxynivalenol in Wheat Cultivars, The 1998 NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, CHAPTER 2, P.21-25）。又、*F. graminearum*、*F. culmorum* は DON 生産能を有するが、*F. avenaceum*、*M. nivale* は DON を生産し
- 20 ないことも近年明らかにされ、メトキシアクリレート剤で *M. nivale* を防除すると拮抗する *F. graminearum*、*F. culmorum* の増加をもたらし、結果として DON 汚染量の増加を助長するといった報告もなされているように、殺菌剤施用による病害防除だけでは DON 汚染を十分防ぐことはできていない。更に麦類生産現場では各種殺菌剤の複合施用による麦類赤かび病の防除を行っても 1. 1 p p
- 25 m を超える DON が検出されるといった事例が頻出し、生産者にとっては悩みの種となっている。つまり、従来の技術であるマイコトキシン生産能を有する病原性真菌類の防除だけでは DON 汚染量を十分抑制することはできないのである。本請求書記載のホセチルに関しても植物病原性真菌に対する殺菌効果（米国特許第 4 1 3 9 6 1 6 号公報（1979年）及び特開昭 6 2－8 7 5 0 4 号公

報)は公知のものとなっているが、マイコトキシンによる植物汚染への効果、影響については一切触れられていない。このような状況の下、麦類の生産現場においては実質的な DON 汚染量を抑制する方法の確立が強く望まれているのが現状である。

- 5      本発明者らは、小麦のマイコトキシン汚染、特に DON による汚染量を 1. 1 p p m 以下若しくは、可能な限り低汚染量へと抑制する農業用組成物を検討した結果、亜リン酸及び亜リン酸エステルの、アンモニウム塩、第 1～4 級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の化合物 A を有効成分として開発された農園
- 10   芸用組成物が、麦類赤かび病原性真菌に対する防除効果は低いがマイコトキシン汚染、特に DON 汚染に対し優れた汚染抑制効果を有することを見出し、本発明を完成した。

- また、本発明者らは、他の農園芸用殺菌剤との混用処理により、基準値 1. 1 p p m を超える高濃度の DON 汚染が観測された殺菌剤との混用においては基
- 15   準値以下への DON 汚染量の低減、また元々低い汚染レベルを示す殺菌剤との混用でも DON 汚染量の更なる抑制効果を示し、農園芸殺菌剤の単独処理時に比して DON 汚染量を低減する効果を併せて見出し、本発明を完成した。

#### 発明の開示

- 20      本発明は、亜リン酸及び亜リン酸エステルの、アンモニウム塩、第 1～4 級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の化合物 A を麦類に施用することを特徴とする、麦類中のマイコトキシン（特に、デオキシニバレノール）汚染量を抑制する方法である。
- 25      また、本発明は、前記化合物 A 及び 1 種又は 2 種以上の農園芸用殺菌活性成分（以下、化合物 B とする）を組み合わせ（好適には、両者を有効成分として含有する組成物として）麦類に施用することを特徴とする、麦類中のマイコトキシン（特に、デオキシニバレノール）汚染量を抑制する方法に関する。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、亜リン酸誘導体及びアルキル亜リン酸誘導体による DON 汚染抑制効果の試験結果（実施例 1）を表す。

図 2 は、亜リン酸カリウムと各種殺菌剤の混用効果の試験結果（実施例 3）を表す。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明の提供する亜リン酸から誘導されかつ亜リン酸並びに亜リン酸エステルのアンモニウム塩、第 1～4 級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩および多価金属塩としては、マイコトキシン、特に DON による汚染を抑制するものであれば特に限定されるものではないが、例えば亜リン酸及び亜リン酸エステルのアルカリ金属塩および多価金属塩を挙げることができ、好適には亜リン酸カリウム及びトリス（エチルホスホナート）のアルミニウム塩（一般名、ホセチル）である。

本発明の小麦のマイコトキシン汚染、特に DON 汚染抑制効果を検定する方法としては、野外で耕種した小麦に対し亜リン酸および亜リン酸エステル誘導体の単独処理及び他の殺菌剤組成物の混用処理を行ったものと、薬剤処理を行わない対象群との DON による汚染濃度、小麦赤かび病発病穂率および発病小穂率の比較を行うことにより判定若しくは測定する方法を挙げることが出来る。

このような方法により、亜リン酸から誘導されかつ亜リン酸並びに亜リン酸エステルのアンモニウム塩、第 1～4 級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩および多価金属塩が麦類病原性真菌の防除とは無関係にマイコトキシン汚染、特に DON 汚染に対し優れた抑制効果を有することが確認された。

本発明において化合物 B は、通常の農園芸用殺菌活性化合物であればよく、好適には、例えば、トリアゾール骨格を有するステロール生合成阻害 (SBI) 剤、アゾキシストロビン、クレソキシムメチル及びイミノクタジンのような、麦赤かび病に有効な殺菌活性化合物である。

## 実施例

以下に本発明の有効成分である化合物Aとして亜リン酸カリウムおよびトリス（エチルホスホナート）のアルミニウム塩（一般名、ホセチル）を用いた試験例を挙げ本発明のさらに具体的な説明を行うが、本発明はこれに限定されるものではない。

### 実施例1 単用（土慣行防除）効果

小麦（品種：ハルユタカ）を2002年4月19日に播種し、慣行の栽培基準（平成7年、北海道農務部）に従って栽培し、1区6.75m<sup>2</sup>の試験区（3反復）を設けた。化合物Aとして亜リン酸カリウムおよびトリス（エチルホスホナート）のアルミニウム塩（一般名、ホセチル）を供して、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>として0.038～0.120%の水溶液を調製し10a当たり100Lをつぎの生育時期に葉面散布を行った。即ち第1回目（6月28日：開花期）、第2回目（7月8日：開花10日後）、第3回目（7月18日：開花20日後）である。なおお植物病害虫の防除を目的とした慣行防除を併せて行った。即ち第1回目〔6月20日：アゾキシストロビン（2000倍希釈）＋フェニトロチオン（1000倍希釈）〕、第2回目〔6月28日：テブコナゾール（2000倍希釈）＋スミチオン（1000倍希釈）〕、第3回目〔7月8日：プロピコナゾール（2000倍希釈）＋フェニトロチオン（1000倍希釈）〕、第4回目〔7月17日：テブコナゾール（2000倍希釈）＋フェニトロチオン（1000倍希釈）〕である。対象として、慣行防除のみを施した試験区及び全く防除を行わない無防除試験区を設けた。収穫は8月9日（出穂後52日）に試験区内から4m<sup>2</sup>分を刈り取った。収穫後2.2mmの縦目篩にかけた整粒を高速粉砕機で粉砕しその全粒粉を分析用試料とした。DON汚染濃度は市販のr-biopharm社製 RIDA SCREEN FAST DON を用い ELISA 法により分析した。

分析試料液の調整並びに分析手順について簡単に述べる。

- ・全粒粉5gに水100mlを加え、10分間激しく攪拌しDON抽出液とする。
- ・DON抽出液を高速遠心処理し、その上澄み液をELISA分析に供した。
- ・ELISAキット記載の方法に従い各種試薬を加えた後、各試験溶液の吸光度を

測定した。

・各試験溶液の DON 濃度は DON 標準溶液を用いて作成した検量線から読み取った。

・赤かび病発病穂率は、各区  $1 \text{ m}^2$  中の穂数とその中に含まれる罹病穂数を数えて算出した。

本試験の結果を表 1 に示す。

表 1 亜リン酸誘導体及びアルキル亜リン酸誘導体による DON 汚染抑制効果  
(2002 年 ハルユタカ)

	処理内容			DON 濃度 (ppm)	赤かび病罹病 穂率 (%)
	有効成分 A	濃度	防除体系		
1	亜リン酸カリウム	0.038%	慣行防除	2.41	0.3
2		0.070%	慣行防除	0.59	0.0
3		0.112%	慣行防除	0.39	0.9
4			無防除	0.69	1.2
5	ホセチル	0.120%	慣行防除	0.84	0.0
6	リン酸カリウム	0.112%	慣行防除	4.66	0.0
7			慣行防除	6.16	0.9
8			無防除	8.69	4.9

10 注) 有効成分 A の濃度は  $\text{P}_2\text{O}_5$  換算濃度。

注) 赤かび病罹病穂率は各区  $1 \text{ m}^2$  中の穂数とその中に含まれる罹病穂数より算出した。

無防除区並びに麦類赤かび病防除用の殺菌剤組成物を用いた慣行防除区からは厚生労働省の提示した暫定的基準値  $1.1 \text{ ppm}$  をはるかに上回る高汚染水準の DON が検出された。一方、亜リン酸カリウムおよびトリス（エチルホスホナート）のアルミニウム塩（一般名、ホセチル）処理区では処理濃度依存的な DON 汚染抑制が見られ、その汚染レベルも  $1.1 \text{ ppm}$  を下回った。特筆すべ



- きは、慣行防除を行わない無防除区においても亜リン酸カリウムを施用することにより DON 汚染濃度が十分抑制されていることである。さらに正リン酸の塩であるリン酸カリウムを施用しても DON 抑制効果は低く、亜リン酸およびアルキル亜リン酸誘導体が重要な役割を果たしていることは明らかである。また赤
- 5 かび病罹病穂率が同程度であっても亜リン酸カリウム無処理区からは高濃度の DON が検出された。このように亜リン酸ならびにアルキル亜リン酸及びその誘導体の処理による DON 汚染濃度抑制効果は明らかである。

#### 実施例 2 実施例 1 のうち麦類赤かび病被害種子での毒素抑制効果

- 実施例 1 で得た玄麦粒より健全粒および麦類赤かび病被害粒を選別し、その
- 10 全粒粉の DON 汚染濃度を実施例 1 同様、ELISA 法により分析した。

本試験の結果を表 2 に示す。

表 2 赤かび病被害粒の DON 汚染濃度

	処理内容			DON 濃度 (ppm)	
	有効成分 A	濃度	防除体系	健全粒	被害粒
1	亜リン酸カリウム	0.038%	慣行防除	0.05	76.6
2		0.070%	慣行防除	0.04	44.7
3		0.112%	慣行防除	0.04	25.4
4			無防除	0.04	75.6
5	ホセチル	0.120%	慣行防除	0.96	11.0
6	リン酸カリウム	0.112%	慣行防除	0.06	86.9
7			慣行防除	1.72	90.0
8			無防除	0.73	173.0

注) 有効成分 A の濃度は  $P_2O_5$  換算濃度。

- 15 注) 赤かび病特有の紅色、橙色着色粒及び、萎縮粒を被害粒、それ以外を健全粒とした。

健全粒の DON 汚染濃度は概ね低レベルで推移した。一方、赤かび病被害粒か

- らは予想通り非常に高濃度の DON が検出された。しかし、同じ被害粒と判断された玄麦でも DON 汚染濃度には差が見られた。つまり亜リン酸カリウム処理区で見ると、亜リン酸カリウムの施用濃度に依存し DON 汚染濃度も減少した。このように亜リン酸カリウムの施用が麦類赤かび病被害の有無や程度とは関係なく小麦中の DON 汚染濃度を抑制すること、更に DON 汚染の抑制程度は亜リン酸カリウムの施用濃度に依存していることは明らかである。

### 実施例 3 混用①

- 小麦（品種：ハルユタカ）を 2002 年 4 月 23 日に播種し、慣行の栽培基準（平成 7 年、北海道農務部）に従って栽培し、1 区 10 m<sup>2</sup> の試験区（3 反復）を設けた。展着剤（グラミン S：北海三共社製）と水からなる液体混合物中に亜リン酸カリウム及び各種殺菌剤を含む懸濁液を調製した。化合物 A として亜リン酸カリウムを供して、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> として 0.070%、化合物 B として麦用の農園芸用殺菌剤を供して、0.006～0.025% 含む水溶液を調製し 10 a 当たり 100 L をつぎの生育時期に葉面散布を行った。即ち第 1 回目（6 月 24 日：出穂期）、第 2 回目（6 月 30 日：開花期）、第 3 回目（7 月 9 日）である。収穫は 8 月 12 日（出穂後 50 日）に試験区内から 3.4 m<sup>2</sup> 分を刈り取った。収穫後 2.2 mm の縦目篩にかけた整粒を高速粉砕機で粉砕しその全粒粉を分析用試料とした。DON 汚染濃度は厚生労働省が示した公定法の中から HPLC-UV 法を用い分析した。なお定量分析は各試験区につき 3 反復で行い定量値はその平均値とした。

分析試料液の調整並びに分析手順について簡単に述べる。

- ・全粒粉 50 g に 85% アセトニトリルを加え 30 分間激しく攪拌した後、10 分間超音波処理を行った
- ・濾紙により不溶物を除去した後、濾液を前処理カラム MultiSep #227 で精製し分析用溶液とした。
- ・分析用試験溶液を高速液体クロマトグラフィーに注入し、紫外線により DON を検出した。
- ・各試験溶液の DON 濃度は DON 標準溶液を用いて作成した検量線から読み取った。

- ・赤かび病発病穂率および発病小穂率は各区 100 穂について調査した。  
本試験結果を表 3 に示す。

表 3 亜リン酸カリウムと各種殺菌剤の混用効果

	有効成分 A 亜リン酸カリウ ムの有無	有効成分 B 有効成分濃度	DON 濃度 (ppm)	発病穂率 (%)	発病小穂数/ 穂
1	×	テブコナゾール	0.39	0.3	0.003
2	○	0.020%	0.38	1.0	0.010
3	×	メトコナゾール	0.34	0.7	0.007
4	○	0.006%	0.10	1.0	0.010
5	×	プロピコナゾール	1.01	1.0	0.010
6	○	0.017%	0.72	2.7	0.027
7	×	アゾキシストロビ	4.65	2.3	0.027
8	○	ン 0.010%	0.96	2.0	0.023
9	×	クレソキシムメチ	1.05	0.3	0.003
10	○	ル 0.021%	0.51	0.7	0.007
11	×	イミノクタジン酢	1.04	1.7	0.017
12	○	酸塩 0.025%	0.20	3.0	0.030
13	○		0.77	4.3	0.050
14	無処理		3.69	6.7	0.138

- 5 注) 亜リン酸カリウムは  $P_2O_5$  として 0.070% ; ○ : 処理、× : 無処理  
注) 各試験区 100 穂について発病穂率、発病小穂率を調査した。

#### 実施例 4 混用②

- 小麦 (品種 : ハルユタカ) を 2003 年 5 月 4 日に播種し、慣行の栽培基準  
10 (平成 7 年、北海道農務部) に従って栽培し、1 区  $10 m^2$  の試験区 (3 反  
復) を設けた。展着剤 (グラミン S : 北海三共社製) と水からなる液体混合物

中に亜リン酸カリウム及び各種殺菌剤を含む懸濁液を調製した。化合物 A として亜リン酸カリウムを供して、 $P_2O_5$  として 0.070%、化合物 B として麦用の農園芸用殺菌剤を供して、0.030～0.125% 含む水溶液を調製して 10a 当たり 100L をつぎの生育時期に葉面散布を行った。即ち第 1 回目

5 (開花期：7 月 1 日)、第 2 回目 (7 月 7 日)、第 3 回目 (7 月 14 日) である。収穫は 8 月 25 日に試験区内の全部を刈り取った。収穫後、均分器により均分化し、2.2mm の縦目篩にかけた整粒を高速粉砕機で粉砕しその全粒粉を分析試料とした。DON 汚染濃度は実施例 1 同様、ELISA 法により分析した。

10

表 4 亜リン酸カリウムと各種殺菌剤の混用効果

	有効成分 A 亜リン酸カリウム の有無	有効成分 B 有効成分濃度	DON 濃度 (ppm)	発病穂率 (%)	発病小穂数 /穂
1	×	テブコナゾール 0.020%	0.16	7.0	7.3
2	○		0.08	5.0	5.0
3	×	プロピコナゾール 0.017%	0.57	4.7	5.0
4	○		0.11	4.7	5.0
5	×	アゾキシストロビン 0.010%	0.83	4.3	4.7
6	○		0.50	3.7	4.0
7	×	トリフロキシストロ ビン 0.025%	0.35	4.3	5.0
8	○		0.12	3.0	3.0
9	×	イミノクダジン アルベシル酸塩 0.030%	0.22	7.3	8.0
10	○		0.00	2.7	2.7
11	×	イオウ 0.125%	1.85	8.7	10.3
12	○		0.43	8.7	8.7
13	○		0.57	10.3	11.0
14	無処理		2.15	20.4	23.8

注) 亜リン酸カリウムは  $P_2O_5$  として 0.070% ; ○ : 処理、× : 無処理

注) 各試験区 100 穂について発病穂率、発病小穂率を調査した。

- 実施例 3 同様、いずれの農園芸用殺菌剤との混用でも単独処理時に比して発病穂率、発病小穂率とも高い値を示したが、DON 汚染量は抑制される結果となった。特筆すべきは、化合物 A の単剤処理区の結果であり、麦類赤かび病の罹
- 5 病率が高いにもかかわらず DON 汚染量は低いレベルとなった。

#### 実施例 5 菌の増殖と毒素産生への影響①

- 珪リン酸カリウムを 5.600% 含む水溶液を調製しガス滅菌を施した小麦種子「ホクシン」に吸水後、DON 生産能を有する麦類赤かび病原性真菌 *Fusarium graminearum* を接種し 27℃ で培養した。培養 7 日、14 日、21 日、
- 10 28 日目にそれぞれ麦粒に存在する麦類赤かび病原性真菌量と DON 生産量を分析した。

エルゴステロール分析試料液の調製並びに分析手順について簡単に述べる。

- ・培養物 5 g にエタノール 80 ml を加え、高速粉砕機で粉砕する。
- ・培養物の粉砕物を含むエタノール溶液を 30 分間激しく振とうしエルゴステ
- 15 ロールを抽出する。
- ・濾紙により不溶物を除去した後、濾液を減圧濃縮、乾固し、エタノール 10 ml に再溶解したものを分析試料液とした。
- ・分析試料液を高速液体クロマトグラフィーに注入し、紫外線によりエルゴステロールを検出した。

- 20 DON 分析試料液の調製並びに分析手順について簡単に述べる。

- ・培養物 4 g に蒸留水 80 ml を加え、高速粉砕機で粉砕する。
- ・培養物の粉砕物を含む水溶液を 30 分間激しく振とうし DON を抽出する。
- ・抽出液の一部を遠心処理し上澄み液を ELISA 分析に供した。
- ・ELISA キット記載の方法に従い各種試薬を加えた後、各試験溶液の吸光度を
- 25 測定した。
- ・各試験溶液の DON 濃度は DON 標準溶液を用いて作成した検量線から読み取った。

表 5 亜リン酸カリウム処理小麦における菌生育、DON 生産経時変化

処理内容	分析項目	培養日数			
		7 日	14 日	21 日	28 日
亜リン酸カリウム 5.6%	DON (ppm)	ND.	ND.	ND.	ND.
	エルゴステロール ピーク面積値	17952	115921	372377	350972
無処理	DON (ppm)	6.3	4.43	4.29	37.8
	エルゴステロール ピーク面積値	150453	271882	367236	559014

注) ND. は分析値が E L I S A 分析キットの検出限界 (0.222 ppm) 未満であることを意味する。

- 菌体量の指標となるエルゴステロール量は、無処理では培養期間中継続的な増加を見せるのに対し、亜リン酸カリウム処理では 21 日目に頭打ちとなった。DON 生産量については、無処理では培養初期より DON の生産は始まっており、培養 28 日目に極端な増加を見せた。これに対し、亜リン酸カリウム処理では、培養期間を通じて DON を検出するには至らなかった。亜リン酸カリウムの施用は麦類赤かび病菌の有無や増殖程度とは関係なく、DON 生産抑制効果が高いことは明らかである。

#### 実施例 6 菌の増殖と毒素産生への影響②

- 亜リン酸カリウムを 0.056～2.800% 含む水溶液を調製しガス滅菌を施した小麦種子「ホクシン」に吸水後、DON 生産能を有する麦類赤かび病原性真菌 *Fusarium graminearum* を接種し 27℃ で培養した。培養 28 日目にそれぞれ麦粒に存在する麦類赤かび病原性真菌量と DON 生産量を実施例 5 と同様の方法により分析した。

表6 麦類赤かび病原性真菌の菌量及びDON生産量に及ぼす亜リン酸カリウムの濃度効果

処理濃度	DON(ppm)	エルゴステロールピーク面積
0.056%	1.60	1834861
0.112%	0.41	1769582
0.028%	ND.	1810454
0.560%	ND.	1921693
2.800%	ND.	85891
無処理	46.1	3601748

注) ND. は分析値がELISA分析キットの検出限界(0.222 ppm)未満であることを意味する。

- 5 エルゴステロール量を菌体量の指標と考えると亜リン酸カリウム0.056～0.560%水溶液の処理は無処理(水のみ)に比べて中程度から同程度の菌量抑制効果を、亜リン酸カリウム2.800%水溶液の処理で顕著な菌量抑制効果を示した。DON量については亜リン酸カリウム水溶液濃度0.056～2.800%の範囲で、無処理に比較して有意に低かった。亜リン酸カリウムの施用は麦類赤かび病菌の有無や増殖程度とは関係なく、DON生産抑制効果が
- 10 高いことは明らかである。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明により、亜リン酸及び亜リン酸エステルの、アンモニウム塩、第1～
- 15 4級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される1種又は2種以上の化合物Aを生育中の小麦に散布することで、麦類赤かび病原性真菌に対する防除効果は低い、麦類赤かび病害の有無や程度とは関係なくマイコトキシン汚染、特にDON汚染に対し優れた汚染抑制効果を有することを明らかにした。また他の農園芸用殺菌剤との混用処理により、殺菌剤の単独処理時よりもマイコトキシンによる汚染量を低減する
- 20 効果を併せて明らかにした。

## 請 求 の 範 囲

1. 亜リン酸及び亜リン酸エステル、アンモニウム塩、第1～4級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される1種又は2種以上の化合物Aを麦類に施用することを特徴とする、  
5 麦類中のマイコトキシン汚染量を抑制する方法。
2. マイコトキシンがデオキシニバレノールである請求項1に記載の方法。
3. 化合物Aがトリス（エチルホスホナート）のアルミニウム塩である、請求項1に記載の方法。
- 10 4. 化合物Aが亜リン酸カリウムである、請求項1に記載の方法。
5. 化合物A及び1種又は2種以上の農園芸用殺菌活性成分を組み合わせて麦類に施用することを特徴とする、請求項1に記載の方法。
6. 化合物A及び1種又は2種以上の農園芸用殺菌活性成分を有効成分として含有する組成物を麦類に施用することを特徴とする、請求項5に記載の方法。
- 15 7. 農園芸用殺菌活性成分が、テブコナゾール、メトコナゾール、プロピコナゾール、アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、イミノクタジン酢酸塩、トリフロキシストロビン、イミノクタジンアルベシル酸塩及びイオウからなる群より選択される、請求項5又は6に記載の方法。



## 補正書の請求の範囲

[2004年4月5日 (05. 04. 04) 国際事務局受理：出願当初の請求の範囲  
1-7は補正された；新しい請求の範囲8-10が加えられた。(2頁)]

- 5 1. (補正後) 亜リン酸及び亜リン酸エステルの、アンモニウム塩、第1～4級アンモニウム塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及び多価金属塩よりなる群から選択される1種又は2種以上の化合物Aを有効成分として含有する、麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  - 10 2. (補正後) 化合物Aが亜リン酸及び亜リン酸エステルのアルカリ金属塩又は多価金属塩である、請求の範囲第1項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  - 10 3. (補正後) 化合物Aがトリス (エチルホスホナート) のアルミニウム塩である、請求の範囲第1項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  4. (補正後) 化合物Aが亜リン酸カリウムである、請求の範囲第1項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  - 15 5. (補正後) 化合物Aおよび1種又は2種以上の農園芸用殺菌活性成分を含有する、請求の範囲第1項乃至第4項のいずれか1項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  - 20 6. (補正後) トリアゾール骨格を有するステロール生合成阻害剤、メトキシアクリレート系殺菌剤、菌類の膜脂質二重層構造の破壊を引き起こす殺菌剤及びイオウからなる群から選択される1種又は2種以上の農園芸用殺菌活性成分を含有する、請求の範囲第5項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  - 25 7. (補正後) テブコナゾール、メトコナゾール、プロピコナゾール、アゾキシストロビン、クレソキシムメチル、イミノクタジン酢酸塩、イミノクタジンアルベシル酸塩、トリフロキシストロビン及びイオウからなる群から選択される1種又は2種以上の農園芸用殺菌活性成分を含有する、請求の範囲第5項又は第6項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  8. (追加) 農園芸用殺菌活性成分がアゾキシストロビン、イミノクタジン酢酸塩又はイミノクタジンアルベシル酸塩である、請求の範囲第5項乃至第7項のいずれか1項に記載の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物。
  9. (追加) 請求の範囲第1項乃至第8項のいずれか1項に記載の麦類のマイコ
- 補正された用紙 (条約第19条)

トキシシン汚染抑制用組成物を、麦類に施用することを特徴とする、麦類のマイコトキシシン汚染量を抑制する方法。

10. (追加) マイコトキシシンがデオキシニバレノールである、請求の範囲第9項に記載の方法。

## 条約第 19 条（１）に基づく説明書

請求の範囲第 1 項に記載の発明は、特定の有効成分を含むことを特徴とする、麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物である。

- 5 国際調査報告に列挙された文献には、化合物または組成物の殺菌効果について記載されているが、本願明細書第 3 頁第 14 行～第 4 頁第 4 行に記載したように、赤かび病罹病程度と赤かび病原性真菌が産生するマイコトキシン（DON）汚染量の間に直接的な関連性がないことは既に明らかであり、各種殺菌剤の複合施用による麦類赤かび病の防除を行っても 1. 1 p p m を超える DON が検出されると
- 10 いった事例が頻出している。つまり、従来の技術である病原性真菌類の防除だけでは DON 汚染量を十分抑制することはできないのである。

このように、病原性真菌類の殺菌効果は、マイコトキシン汚染抑制効果とは全く異なるものである。この点において、本願発明の特徴は、病原性真菌類に対する殺菌効果よりも、むしろ、マイコトキシンの生合成を阻害することにある。

- 15 したがって、本願の麦類のマイコトキシン汚染抑制用組成物は、いずれの文献にも記載も示唆もされていない。

図 1

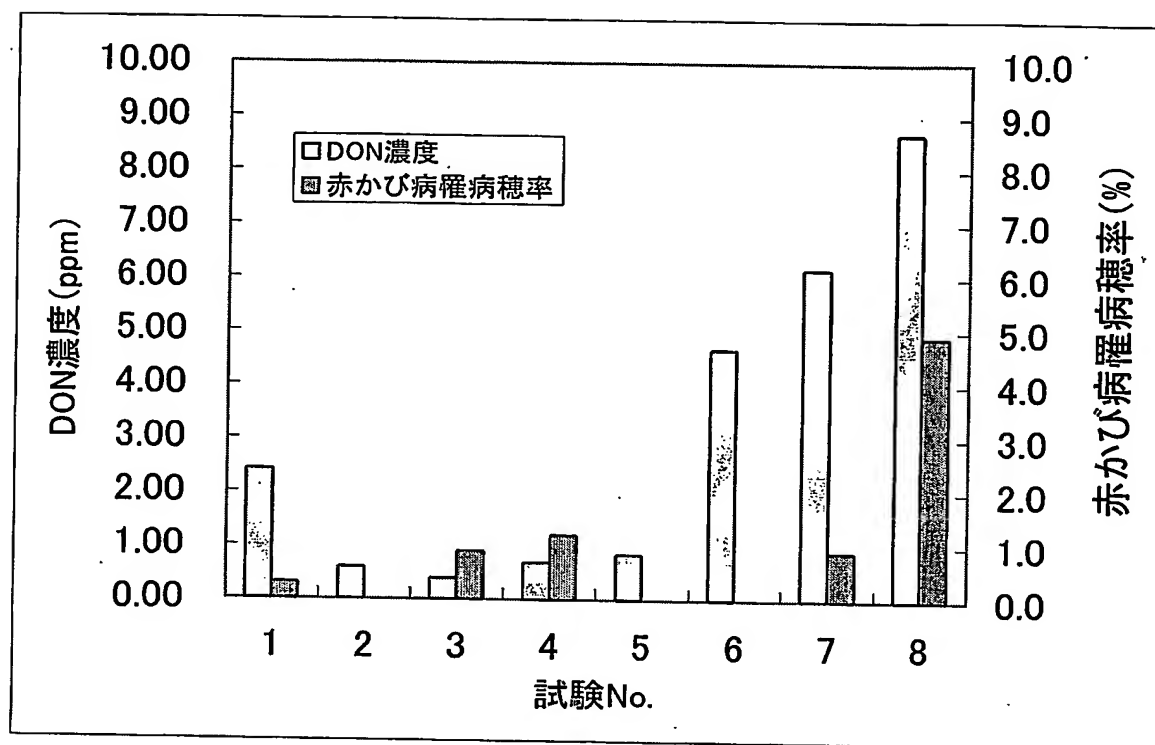
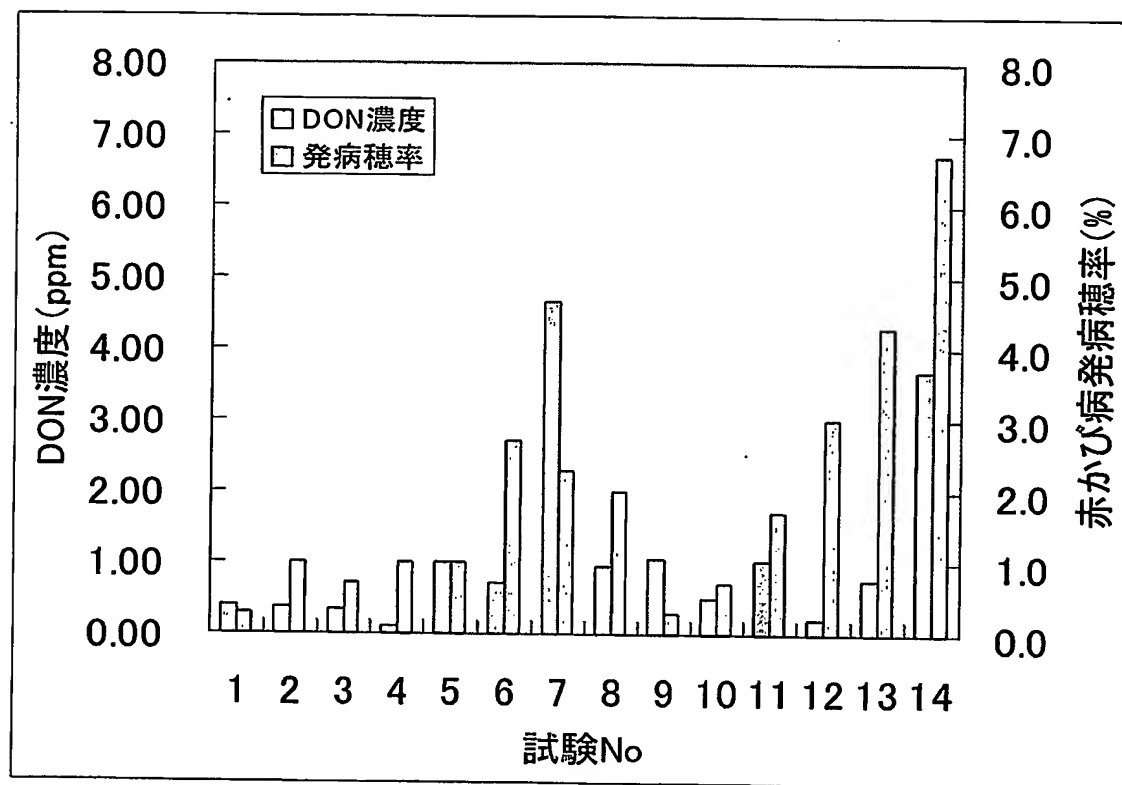


図 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15543

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A01N57/12, 59/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A01N57/12, 59/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA(STN), REGISTRY(STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 467792 A1 (RHONE-POULENC AGROCHIMIE), 22 January, 1992 (22.01.92), Full text & JP 4-230204 A & US 5290791 A	1-6
X	GB 2279252 A (Rhone-Poulenc Agrochimie), 04 January, 1995 (04.01.95), Full text & JP 7-59411 A & DE 4422025 A1	1, 2, 4
X	WO 98/19544 A1 (Sankyo Co., Ltd.), 14 May, 1998 (14.05.98), Full text & JP 10-273407 A & EP 945065 A1	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 January, 2004 (06.01.04)	Date of mailing of the international search report 03 February, 2004 (03.02.04)
--	--

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15543

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/53761 A1 (PHONE-POULENC AGRO), 28 October, 1999 (28.10.99), Full text & JP 2002-511495 A & EP 1071332 A1	1-3
X	WO 00/46169 A2 (MANDOPS (UK) LTD.), 10 August, 2000 (10.08.00), Full text & JP 2002-536281 A & EP 1161405 A2	1, 2, 4
X	WO 02/076215 A1 (Sankyo Co., Ltd.), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text & JP 2002-348203 A	1, 2, 4
X	JP 2002-255704 A (Sankyo Co., Ltd.), 11 September, 2002 (11.09.02), Full text (Family: none)	1, 2, 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A01N57/12, 59/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> A01N57/12, 59/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN)  
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 467792 A1 (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 199 2. 01. 22 全文 & JP 4-230204 A & U S 5290791 A	1-6
X	GB 2279252 A (Rhône-Poulenc agrochimie) 199 5. 01. 04 全文 & JP 7-59411 A & DE 4422025 A1	1, 2, 4
X	WO 98/19544 A1 (三共株式会社) 1998. 05. 14 全文 & JP 10-273407 A & EP 94	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 01. 2004

国際調査報告の発送日

03. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4H

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3443



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	5065 A1	
X	WO 99/53761 A1 (RHONE-POULENC AGRO) 1999. 10. 28 全文 & JP 2002-511495 A & EP 1071332 A1	1-3
X	WO 00/46169 A2 (MANDOPS(UK)LIMITED) 2000. 08. 10 全文 & JP 2002-536281 A & EP 1161405 A2	1, 2, 4
X	WO 02/076215 A1 (三共株式会社) 2002. 1 0. 03 全文 & JP 2002-348203 A	1, 2, 4
X	JP 2002-255704 A (三共株式会社) 2002. 0 9. 11 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4